

09.1

Достижение субпикосекундного временного разрешения при исследовании процессов анизотропной релаксации биологических молекул

© И.А. Горбунова, М.Э. Сасин, О.С. Васютинский

Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, Россия
E-mail: i.gorbunova@mail.ioffe.ru

Поступило в Редакцию 7 октября 2019 г.

В окончательной редакции 25 октября 2019 г.

Принято к публикации 1 ноября 2019 г.

Разработан новый метод по схеме накачка–зондирование для исследования процессов анизотропной релаксации и переноса энергии в возбужденных состояниях многоатомных молекул при их возбуждении фемтосекундными лазерными импульсами. Метод применен для исследования процессов вращательной диффузии молекул NADH с временным разрешением около 0.6 ps. Впервые удалось зарегистрировать поглощение биологическими молекулами, находящимися в возбужденном состоянии, при накачке лазерными импульсами с энергией менее 1 nJ.

Ключевые слова: метод накачка–зондирование, анизотропная релаксация, спектроскопия переходного поглощения, NADH.

DOI: 10.21883/PJTF.2020.04.49041.18062

Спектроскопия переходного поглощения является мощным методом исследования быстрых фотоиндуцированных процессов, таких как перенос электронов и протонов, процессов изомеризации, а также исследования динамики возбужденных состояний. Особенно эффективной оказалась схема накачка–зондирование (pump–probe), при которой импульс накачки индуцирует фотопроект, а зондирующий импульс, задержанный относительно первого, контролирует изменение оптических свойств образца [1,2].

Эта схема уже много лет применяется для изучения быстрых процессов в газовых и конденсированных средах [2–4]. Исследования быстрых процессов в биологических молекулах, возникающих при их возбуждении (релаксация возбужденных состояний, безызлучательная рекомбинация, вращательная диффузия, процессы переноса энергии), позволяют достигнуть ранее недоступного уровня понимания динамики внутри- и межмолекулярных взаимодействий [5–8].

Динамика возбужденных состояний многоатомных молекул, в том числе биологических, в значительной степени определяется быстрыми процессами анизотропной релаксации, которые успешно исследуются как с помощью наблюдения затухания поляризованной флуоресценции [9–11], так и методами накачка–зондирование с использованием различных комбинаций поляризации накачивающего и зондирующего пучков [4–6].

В настоящей работе сообщается о разработке и апробации нового метода по схеме накачка–зондирование для исследования процессов быстрой анизотропной релаксации и переноса энергии в возбужденных состояниях многоатомных молекул при их возбуждении фемтосекундными лазерными импульсами. Метод основан

на высокочастотной модуляции поляризации накачивающего лазерного пучка с использованием фотоупругого модулятора с последующим выделением анизотропного вклада в регистрируемые сигналы с помощью высокочувствительной балансной схемы и дальнейшего синхронного детектирования. Метод был применен для исследования процессов вращательной диффузии восстановленной формы молекул NADH (никотинамид-аденин-динуклеотид) в водном растворе в субпикосекундном временном диапазоне. При этом было достигнуто временное разрешение 0.6 ps и продемонстрирована рекордная чувствительность, позволившая впервые зарегистрировать поглощение зондирующего лазерного излучения биологическими молекулами, возбужденными лазерными импульсами с энергией менее 1 nJ.

Кофермент NADH является одной из наиболее важных биологических молекул, так как он принимает активное участие в протекании окислительно-восстановительных реакций в клетках живых организмов. Поскольку NADH обладает интенсивной флуоресценцией, он широко используется в качестве естественного флуоресцентного зонда для исследования биохимических процессов в живых клетках. Однако, несмотря на многочисленные исследования, процессы переноса энергии в возбужденных состояниях молекул NADH в настоящее время далеки от ясного понимания. В частности, это относится к анизотропной релаксации и переносу энергии между хромофорными группами аденина и никотинамида. Изучение динамики возбужденных состояний в молекулах NADH методом накачка–зондирование проводилось ранее в работах [7,8], однако поляризационно-зависимых измерений и исследований анизотропной релаксации до сих пор не проводилось.

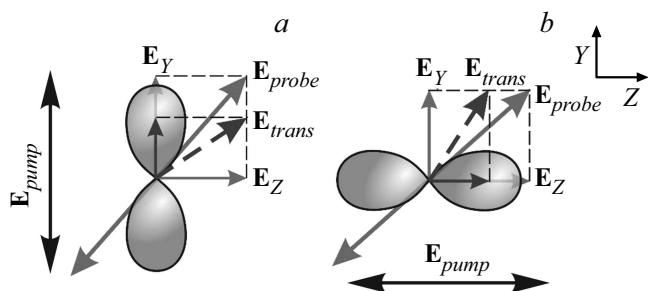


Рис. 1. Методика эксперимента. E_{pump} — направление поляризации луча накачки, E_{probe} — направление поляризации пробного луча, E_{trans} — направление поляризации пробного луча, прошедшего через возбужденную среду. *a* — поляризация излучения накачки направлена вдоль оси Y , оси возбужденных молекул выстроены вдоль оси Y и компонента поляризации пробного пучка, направленная вдоль оси Y , поглощается больше, чем компонента поляризации пробного пучка, направленная вдоль оси Z ; *b* — поляризация излучения накачки направлена вдоль оси Z , оси возбужденных молекул выстроены вдоль оси Z и компонента поляризации пробного пучка, направленная вдоль оси Z , поглощается больше, чем компонента поляризации пробного пучка, направленная вдоль оси Y .

В исследованиях использовалась двухцветная схема накачка—зондирование, в которой лазерный импульс накачки возбуждал электронные переходы в молекулах NADH на длине волны 360 nm, лежащей в полосе поглощения хромофорной группы никотинамида [12], а зондирующий лазерный пучок имел длину волны 720 nm. Длительность импульсов накачки была около 100 fs, частота их повторения составляла 80 MHz, пробные импульсы имели те же характеристики, но были задержаны относительно импульсов накачки на регулируемый интервал времени Δt .

Геометрия эксперимента показана на рис. 1. Направление поляризации лазерного пучка накачки, распространявшегося вдоль оси X , периодически переключалось с вертикального (вдоль оси Y) на горизонтальное (вдоль оси Z) с частотой 100 kHz при помощи фотоупругого модулятора. Зондирующий луч распространялся сонаправленно с возбуждающим лучом и был поляризован под углом 45° к оси Z . Как показано на рис. 1, *a*, при возбуждении молекул NADH светом, линейно поляризованным вдоль оси Y , возбуждались преимущественно те молекулы, оси которых были выстроены вдоль той же оси, и Y -компонента поляризации зондирующего луча поглощалась больше, чем Z -компонента. Аналогично при возбуждении молекул светом, поляризованным вдоль оси Z (рис. 1, *b*), преимущественно поглощалась Z -компонента поляризации зондирующего луча. В обоих случаях наблюдался поворот плоскости поляризации зондирующего луча, прошедшего через поглощающую кювету, который регистрировался с помощью балансной схемы детектирования.

Схема экспериментальной установки представлена на рис. 2.

Источником излучения служил перестраиваемый лазер Mai Tai (Spectra-Physics) с длительностью импульса 100 fs и частотой повторения импульсов 80 MHz. Мощность излучения регулировалась attenuатором 2. Часть излучения основной гармоники лазера с длиной волны 720 nm использовалась в канале зондирования, а часть удваивалась по частоте с помощью удвоителя 3, и излучение второй гармоники с длиной волны 360 nm использовалось в канале накачки. Пучок накачки с энергией импульса около 1 nJ проходил через фотоупругий модулятор PEM-100 (Hinds Instruments) 13, контролируемый генератором частоты 23, и через дихроичное зеркало 11 фокусировался линзой 12 в центр кюветы 10 с раствором. Исследовались водные растворы NADH с концентрацией 0.05–0.2 mM. Для предотвращения быстрого обесцвечивания при воздействии возбуждающего излучения осуществлялась прокачка раствора через кювету с использованием перистальтического насоса.

Зондирующий луч проходил через attenuатор 4 и затем через линию задержки 6. Положение плоскости поляризации зондирующего луча контролировалось посредством волновой пластинки $\lambda/2$ (7). Сфокусированный длиннофокусной линзой 9 зондирующий пучок проходил через кювету, отражался от дихроичного зеркала 11 и фокусировался обратно в центр кварцевой кюветы 10. Поскольку каустики зондирующего и накачивающего лучей совпадали только при втором проходе зондирующего луча через кювету, в эксперименте была фактически реализована схема сонаправленного распространения обоих лучей. Детальный ход пробного и накачивающего лучей через кювету представлен на вставке к рис. 2. Мощность зондирующего пучка на кювете составляла 40 mW, а мощность пучка накачки — 80 mW.

Прошедший через кювету зондирующий луч направлялся в канал регистрации сигнала с помощью делителя 8 и зеркала 5. Для предотвращения попадания прошедшего пучка накачки в канал регистрации использовалась система фильтрации 14, состоящая из дихроичного зеркала и абсорбционного фильтра. Далее при помощи призмы Глана 15 осуществлялось разделение взаимно ортогональных поляризованных компонент зондирующего пучка, которые одновременно и независимо регистрировались фотодиодами 19 и 20. Сигналы с фотодиодов направлялись на входы дифференциального интегратора 21 с полосой пропускания 0–4 MHz, а полученный разностный сигнал, промодулированный по амплитуде на частоте 100 kHz, выделялся синхронным усилителем SR844 RF (Stanford Instruments) 22. Полученный сигнал был обусловлен линейным дихроизмом поглощения зондирующего луча в растворе, причем балансная схема детектирования позволила значительно уменьшить избыточные шумы, вызванные нестабильностью интенсивности излучения лазера и флуктуациями плотности раствора. При этом изменение времени задержки между

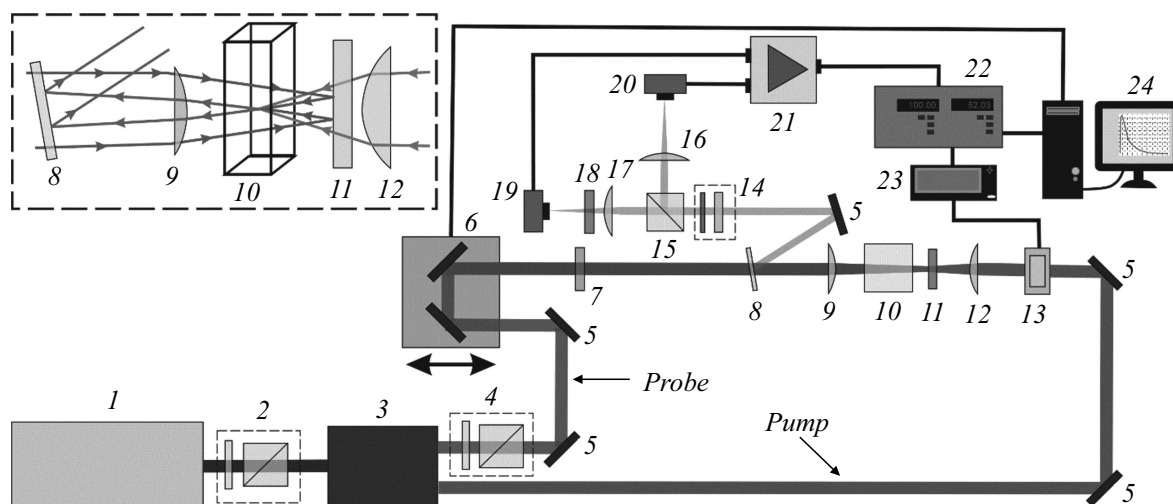


Рис. 2. Схема экспериментальной установки. 1 — лазер, 2, 4 — аттенюаторы, 3 — удвоитель частоты, 5 — поворотные зеркала, 6 — механическая линия задержки, 7 — полуволновая пластинка, 8 — светоделительная пластинка, 9, 12, 16, 17 — собирающие линзы, 10 — кварцевая кювета, 11 — дихроичное зеркало, 13 — фотоупругий модулятор, 14 — система фильтрации, 15 — поляризационная призма, 18 — поляризатор, 19, 20 — кремниевые фотодиоды, 21 — дифференциальный интегратор, 22 — синхронный усилитель, 23 — генератор частоты, 24 — ПК.

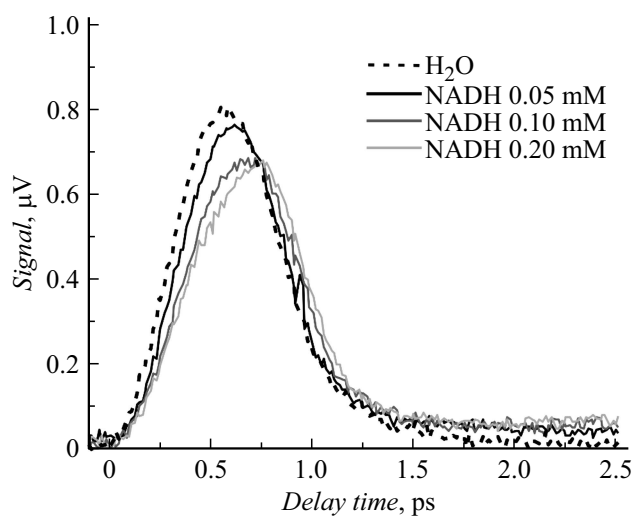


Рис. 3. Экспериментальные сигналы.

накачивающим и зондирующим импульсами позволяло зарегистрировать временную зависимость анизотропной релаксации возбужденных молекул NADH.

На рис. 3 представлены полученные экспериментальные сигналы. Видно, что достигнутое временное разрешение составляет менее 0.6 ps и обусловлено суммарной длительностью обоих лазерных импульсов и их дисперсией при прохождении поглощающей кюветы. Приведенные экспериментальные сигналы были получены для трех водных растворов NADH различной концентрации и для чистой воды. Как видно из рис. 3, для растворов NADH наблюдалось изменение формы линии сигнала по сравнению с сигналом чистой воды,

сопровождающееся уменьшением амплитуды сигналов и сдвигом их максимума в сторону больших времен задержки при увеличении концентрации NADH.

Анализ полученных экспериментальных данных позволит исследовать времена анизотропной безызлучательной релаксации и времена вращательной диффузии в возбужденных состояниях молекул NADH, лежащие в пикосекундном и субпикосекундном диапазонах. Поскольку времена вращательной диффузии пропорциональны вязкости раствора, описанный в работе метод может быть использован для неинвазивного определения локальной внутриклеточной вязкости. Кроме того, так как измеряемые времена зависят от местоположения NADH внутри клетки, метод может быть применен для изучения роли этих коэнзимов в регулировании внутриклеточных окислительно-восстановительных реакций.

Благодарности

Авторы благодарят ФТИ им. А.Ф. Иоффе за предоставление оборудования для проведения экспериментов.

Финансирование работы

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-03-00038).

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] *Henriksen N.E., Engel V.* // *Int. Rev. Phys. Chem.* 2001. V. 20. P. 93–126.
- [2] *Berera R., van Grondelle R., Kennis J.T.M.* // *Photosynth. Res.* 2009. V. 101. P. 105–118.
- [3] *Zhu J., Shcherbakova D.M., Hontani Y., Verkhusha V.V., Kennis J.T.M.* // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. P. 12840.
- [4] *Rumble C., Vauthey E.* // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2019. V. 21. P. 11797–11809.
- [5] *Corrales M.E., Shiernin P.S., Rubio-Lago L., de Nalda R., Vasyutinskii O.S., Banares L.* // *J. Phys. Chem. Lett.* 2016. V. 7. P. 4458–4463.
- [6] *Tros M., Woutersen S.* // *Opt. Lett.* 2015. V. 40. P. 2607–2609.
- [7] *Heiner Z., Roland T., Léonard J., Haacke S., Groma G.I.* // *EPJ Web Conf.* 2013. V. 41. P. 07003.
- [8] *Heiner Z., Roland T., Leonard J., Haacke S., Groma G.I.* // *J. Phys. Chem. B.* 2017. V. 121. P. 8037–8045.
- [9] *Sasin M.E., Smolin A.G., Gericke K.-H., Tokunaga E., Vasyutinskii O.S.* // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2018. V. 20. P. 19922–19931.
- [10] *Denicke S., Gericke K.-H., Smolin A.G., Shternin P.S., Vasyutinskii O.S.* // *J. Phys. Chem. A.* 2010. V. 114. P. 9681–9692.
- [11] *Herbrich S., Al-Hadhuri T., Gericke K.-H., Shternin P.S., Smolin A.G., Vasyutinskii O.S.* // *J. Chem. Phys.* 2015. V. 142. P. 024310.
- [12] *Сасин М.Э., Горбунова И.А., Безверхний Н.О., Бельтоков Я.М., Rubayo-Soneira J., Васютинский О.С.* // *Письма в ЖТФ.* 2019. Т. 45. В. 13. С. 37–39.